

VU Research Portal

Targeting DMARD resistance in Rheumatoid Arthritis

van der Heijden, J.W.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van der Heijden, J. W. (2008). *Targeting DMARD resistance in Rheumatoid Arthritis*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

Patiënten met reumatoïde artritis (RA) worden langdurig behandeld met ontstekingsremmende medicijnen, waaronder de zogenaamde Disease Modifying Anti-rheumatic Drugs (DMARDs). Helaas worden veel patiënten in de loop van de behandeling resistent tegen deze DMARDs. Resistentie tegen antibiotica bij infectieziekten en resistentie tegen cytostatica bij kanker is een bekend fenomeen en daar is veel onderzoek naar gedaan; naar resistentie tegen DMARDs is nog relatief weinig onderzoek verricht.

In dit proefschrift beschrijven wij mogelijke mechanismen van resistentie tegen methotrexaat (MTX) en sulfasalazine, twee veel gebruikte DMARDs bij de behandeling van patiënten met reumatoïde artritis. Daarnaast hebben we onderzoek gedaan naar nieuwe generatie geneesmiddelen die deze mechanismen van resistentie mogelijk kunnen omzeilen. In **hoofdstuk 1 en 2** wordt een overzicht gegeven van de tot nu toe bekende moleculaire mechanismen van resistentie tegen DMARDs.

Vanuit de oncologie is bekend dat een verhoogde expressie van multi-drug resistentie (MDR) eiwitten op de celmembraan van kankercellen kan leiden tot resistentie tegen cytostatica. MDR eiwitten behoren tot de familie van de ATP afhankelijke transporteiwitten, waarvan er 49 bekend zijn. Deze eiwitten zijn in staat chemisch- en functioneel verschillende medicijnen de kankercellen uit te pompen, wat aanleiding geeft tot zogenaamde multi-pele-drug resistentie. Het is bekend dat verschillende DMARDs (onder andere MTX) substraat zijn voor een of meerdere van deze MDR eiwitten (zie tabel 1). Het is echter onbekend welke MDR-eiwitten voorkomen op perifere bloedcellen of ontstekingscellen in synoviaal weefsel van RA-patiënten, en of dit aanleiding geeft tot DMARD resistentie.

Tabel 1: Overzicht van de MDR eiwitten die DMARDs kunnen verpompen

MDR eiwit	DMARD substraat
ABCB1 (Pgp)	chloroquine, glucocorticoiden
ABCC1 (MRP1)	methotrexaat, chloroquine
ABCC2 (MRP2)	methotrexaat
ABCC3 (MRP3)	methotrexaat
ABCC4 (MRP4)	methotrexaat, azathioprine
ABCC5 (MRP5)	methotrexaat, azathioprine
ABCG2 (BCRP)	methotrexaat, sulfasalazine, leflunomide

Meta-analyses hebben aangetoond dat RA-patiënten betrekkelijk snel resistent kunnen worden tegen de DMARD sulfasalazine. In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of MDR-eiwitten betrokken zijn bij resistentie tegen sulfasalazine in een humane T-cel lijn, wanneer deze cellen langdurig blootgesteld worden aan deze DMARD. Na 4-6 maanden blootstelling aan sulfasalazine waren deze cellen een factor 3.5-6.0 resistent geworden. In de resistente cellen bleek een duidelijke opregulatie te zijn van het MDR-eiwit BCRP en een verminderde expressie van MRP1. Door het blokkeren van BCRP, werden de resistente cellen weer gevoelig voor sulfasalazine, waarmee een directe relatie tussen BCRP expressie en sulfasalazine-resistentie werd aangetoond. Verder bleek dat sulfasalazine-resistente cellen na stimulatie meer TNF α produceerden dan controle cellen, wat duidt op een verhoogde ontstekingsactiviteit van deze cellen. De TNF α productie in de resistente cellen kon ook moeilijker worden geremd door sulfasalazine, samenhangend met de verhoogde expressie van BCRP.

In **hoofdstuk 4** werd onderzocht of sulfasalazine-resistentie in de humane T-cel lijn reversibel was als de cellen werden gekweekt in afwezigheid van sulfasalazine. We zagen dat de BCRP expressie een maand stabiel verhoogd bleef, daarna geleidelijk afnam (evenals de resistentie-factor) en na 6 maanden niet meer detecteerbaar was. Echter, wanneer sulfasalazine opnieuw aan het kweekmedium werd toegevoegd, was er weer een snelle inductie van BCRP-expressie waar te nemen en werden de cellen dientengevolge binnen 2 weken opnieuw resistent tegen sulfasalazine. In dit hoofdstuk werd ook onderzocht of er in de sulfasalazine-resistente cellen kruisresistentie bestaat tegen andere DMARDs. Er bleek sprake van kruisresistentie voor leflunomide (factor 5.1) en MTX (factor 1.8), maar juist een verhoogde gevoeligheid voor cyclosporine A, chloroquine (factor 1.8) en dexamethason (factor 13), vergeleken met controle cellen. Vanuit dit oogpunt zou het een goede keuze kunnen zijn om deze laatste middelen voor te schrijven aan patiënten die gefaald hebben op sulfasalazine.

RA-patiënten worden vaak behandeld met een combinatie van DMARDs. Een veel gebruikte combinatie is sulfasalazine met MTX, waaraan vaak nog een derde DMARD zoals chloroquine of prednison wordt toegevoegd. Uit literatuurgegevens

blijkt echter dat de combinatie van sulfasalazine en MTX niet effectiever is dan mono-therapie met deze middelen, tenzij een derde DMARD wordt toegevoegd. Ook in onze laboratoriumstudies zagen we dat sulfasalazine resistente T-cellen minder gevoelig waren voor MTX (hoofdstuk 4), wat niet werd verklaard door verhoogde expressie van het MDR-eiwit BCRP. In **hoofdstuk 5** onderzochten we daarom de farmacologische interactie tussen sulfasalazine en MTX. Dezelfde humane T-cellijn die beschreven werd in hoofdstuk 3 en 4, werd nu gebruikt om het effect van sulfasalazine op de cellulaire opname van MTX en natuurlijke folaten (leucovorin) door de Reduced Folate Carrier (RFC) (het eiwit dat betrokken is bij de opname van MTX en natuurlijke folaten in de cel) te bestuderen. Analyse van de transportkinetiek van de RFC toonde aan dat sulfasalazine een potente (reversibele), niet-competitieve remmer is van de cellulaire opnamecapaciteit voor MTX en leucovorin. In overeenstemming met deze bevinding was dat er MTX resistentie optrad in sulfasalazine-resistente T-cellen in aanwezigheid van 0.25 mM sulfasalazine (resistentiefactor: 3.5) en 2.5 mM sulfasalazine (resistentiefactor >400). Naast MTX-resistentie werd een dosis-afhankelijk remmend effect gezien van sulfasalazine op de opname van leucovorin, wat aanleiding kan geven tot intracellulaire folaat-depletie. Dit onderzoek pleit ervoor dat sulfasalazine en MTX niet gelijktijdig (op dezelfde dag) moeten worden ingenomen, maar juist gespreid, om een maximaal effect te kunnen bereiken. Daarnaast moet er bij deze combinatie in ieder geval foliumzuur worden voorgeschreven om 'gezonde cellen' te beschermen tegen mogelijke folaat-depletie.

In **hoofdstuk 6** werd de expressie van MDR-eiwitten onderzocht op ontstekingscellen in synoviaal weefsel van RA-patiënten met actieve ziekte, voor en na behandeling met MTX (7.5-15 mg/week) of leflunomide (20mg/dag) en 'gezond' synoviaal weefsel van patiënten die een orthopedische operatie ondergingen. Met behulp van immunohistochemische technieken werd de expressie bepaald van Pgp, MRP1-5, MRP8, MRP9 en BCRP. Er werd een hoge expressie gevonden van BCRP in de synoviale lining en op macrofagen en endotheelcellen in de synoviale sublining bij alle patiënten. Statistische analyse liet een trend zien van hogere BCRP expressie in biopten van patiënten met een hoge ziekte-activiteit (gedefinieerd door een hoge DAS28 score). Daarnaast bleek dat de mediane BCRP expressie 4-8 keer zo hoog was in biopten van 'MTX-falers' vergeleken met biopten van patiënten met een

goede respons op MTX na 4 maanden. Dezelfde trend werd gezien voor RA-patiënten die werden behandeld met leflunomide: een 2.5 keer hogere BCRP expressie werd waargenomen in synoviale bipten van 'leflunomide-falers' in vergelijking met patiënten met een goede respons op leflunomide. Naast BCRP werd een duidelijke expressie gevonden van MRP1 op T-cellen (gelegen in aggregaten) en een lage expressie op macrofagen. De expressie van Pgp, MRP2-5, MRP8 en MRP9 was te laag om met immunohistochemische technieken aan te tonen. In 'gezond' synoviaal weefsel, met zeer weinig ontstekingscellen, werden slechts enkele BCRP positieve cellen aangetoond. In dit weefsel werd geen expressie gevonden van de andere MDR-eiwitten. Omdat hoge expressie van BCRP werd aangetoond in synoviale bipten van alle patiënten reeds vóór aanvang van de therapie met MTX, is het waarschijnlijker dat de expressie wordt geïnduceerd door het ontstekingsproces dan door blootstelling aan DMARDs. Omdat aangetoond is dat MTX, sulfasalazine en leflunomide substraten zijn voor BCRP, kan expressie van dit pomp-eiwit op macrofagen echter wel leiden tot resistentie tegen deze geneesmiddelen.

Hoofdstuk 7 is een klinisch georiënteerd review-artikel over de status van MTX en leflunomide (als monotherapie en in combinatieschema's) bij de behandeling van patiënten met RA. Dit hoofdstuk dient als inleiding van hoofdstuk 8, waar *ex vivo* analyses naar de ontstekingsremmende capaciteit van nieuwe generatie anti-folaten (MTX-analoga) worden beschreven. Effectiviteitsstudies laten zien dat MTX en leflunomide zeer potente geneesmiddelen zijn bij de behandeling van RA-patiënten. Lange termijn observationele studies tonen effectiviteit aan van MTX (op vermindering van ziekte-activiteit en gewrichtsschade) gedurende meer dan 5 jaar bij ongeveer 50% van de RA-patiënten. Daarnaast is bewezen dat MTX de effectiviteit van TNF α blokkers (antilichamen tegen TNF α) versterkt, waarschijnlijk via remming van de productie van antistoffen tegen deze middelen door plasmacellen.

Ondanks een aanvankelijk goede respons op behandeling met MTX en een relatief lange gebruiksduur bij 50% van de RA patiënten, worden veel patiënten geconfronteerd met verlies van MTX-effectiviteit bij langdurig gebruik (klinische resistentie). Naast het mechanisme van efflux van MTX via MDR-eiwitten (zoals BCRP en MRP1) kunnen er ook andere oorzaken zijn voor de verminderde

effectiviteit van MTX, zoals eerder is aangetoond voor resistentie van kankercellen tegen MTX. Sommige van deze mechanismen zouden ook een rol kunnen spelen bij de behandeling van RA-patiënten, zoals: (a) verminderde cellulaire opname van MTX via de Reduced Folate Carrier (RFC), (b) verminderde conversie naar polyglutamaat vormen van MTX door een verminderde activiteit van het enzym folylpolyglutamaat synthetase (FPGS), (c) verhoogde expressie van het target-enzym van MTX, dihydrofolate reductase (DHFR) of (d) polymorfismen in genen die coderen voor enzymen in het foliumzuurmetabolisme. Om dit te onderzoeken werd in **hoofdstuk 8** de ontstekingsremmende capaciteit van 8 nieuwe generatie anti-folaten bepaald, die zijn ontworpen om MTX resistentie bij leukemie-patiënten te omzeilen. Deze geneesmiddelen hebben bijvoorbeeld een hogere affiniteit voor de RFC en/of FPGS in vergelijking met MTX of hebben een ander target in het foliumzuurmetabolisme dan DHFR, zoals thymidylate synthase (TS) en glycinamide ribonucleotide transformylase (GARTFase). De effectiviteit van deze geneesmiddelen om $\text{TNF}\alpha$ productie door geactiveerde T-cellen (na $\alpha\text{CD3/CD28}$ stimulatie) te remmen werd onderzocht in volbloed van RA-patiënten. Twee nieuwe generatie DHFR remmers (PT523 en PT644) en twee nieuwe generatie TS remmers (Raltitrexed en GW1843), welke een hoge affiniteit hebben voor zowel RFC en FPGS bleken bij lage concentraties effectief in het remmen van $\text{TNF}\alpha$ productie door geactiveerde T-cellen. De mediane concentraties van deze medicijnen om 50% van de $\text{TNF}\alpha$ productie te remmen (IC-50 waarden) waren 6.9-10.5 keer lager in vergelijking met MTX, ook in volbloed van RA-patiënten die klinisch hadden gefaald op MTX. Deze data tonen aan dat behandeling met deze nieuwe generatie anti-folaten te overwegen is bij RA-patiënten die falen op MTX.

In **hoofdstuk 9** hebben we de folaatreceptor- β (FR- β) onderzocht als potentieel nieuw target voor de behandeling van RA-patiënten. Folaatreceptoren zijn membraangebonden receptoren waarvan drie isotypen bestaan (α, β, γ). Deze receptoren hebben een hoge affiniteit voor foliumzuur en een relatief lage affiniteit voor MTX, waarna opname van deze middelen geschiedt via endocytose van het receptor-ligand complex. Het is bekend dat de FR- β selectief tot expressie komt op geactiveerde synoviale macrofagen en daarom een target voor therapie kan zijn bij patiënten met reumatoïde artritis. Om een voorspelling te kunnen doen over de

potentiële effectiviteit van deze benadering hebben we in eerste instantie de expressie bepaald van de FR- β op ontstekingscellen in intact synoviaal weefsel van RA patiënten en op perifere bloedlymfocyten. Daarnaast werd de bindingsaffiniteit voor de FR- β onderzocht van 10 nieuwe generatie anti-folaten op basis van competitiestudies met [^3H]-foliumzuur op een cellijn die getransfecteerd is met de FR- β . Zoals verwacht kon met behulp van immunohistochemische technieken hoge expressie van de FR- β worden aangetoond op synoviale lining cellen en macrofagen in de synoviale sublining van RA-patiënten, terwijl geen expressie werd gevonden in T-cel gebieden en in 'gezond' synoviaal weefsel. In overeenstemming hiermee werd een hoge mRNA expressie gevonden in synoviaal weefsel van RA-patiënten, een duidelijke expressie werd gezien in ex-vivo gekweekte macrofagen uit perifeer bloed van RA-patiënten, terwijl geen expressie werd waargenomen in monocyten en ex-vivo geactiveerde T-cellen. Screening van 10 nieuwe generatie anti-folaten voor affiniteit voor de FR- β leverde 4 geneesmiddelen op met een hoge affiniteit voor deze receptor (20-77 keer hogere affiniteit dan MTX). Een van deze geneesmiddelen, de TS-remmer BCG945, bleek een heel hoge affiniteit te hebben voor de FR- β , terwijl bekend is dat dit middel een heel lage affiniteit heeft voor de RFC. BGC945 verdient daarom nadere evaluatie als potentiële macrofaag-gerichte therapie bij RA.

Een ander potentieel nieuw target voor de behandeling van patiënten met reumatoïde artritis is NF κ B. Aangenomen wordt dat activatie van deze transcriptie factor een belangrijke rol speelt bij het ontstekingsproces in RA. Om deze reden zijn er diverse therapeutische strategieën ontwikkeld om de activiteit van NF κ B te remmen, bijvoorbeeld door gebruik te maken van directe NF κ B-remmers, NF κ B oligonucleotides om binding van NF κ B aan de promotor tegen te gaan, of remmers van I κ B-kinase. Een andere benadering is blokkade van de proteasoom-afhankelijke afbraak van I κ B α , de natuurlijke remmer van NF κ B. Cel-activatie resulteert normaliter in fosforylering en ubiquitineren van I κ B α . Deze processen zorgen ervoor dat I κ B α kan worden afgebroken door het 26S proteasoom. Nadat I κ B α is afgebroken, kan NF κ B naar de kern worden getransporteerd waar het de transcriptie van pro-inflammatoire cytokines en anti-apoptotische genen kan initiëren. Vanuit dit concept is dus te verwachten dat remmers van het proteasoom deze processen kunnen remmen en daarmee een anti-inflammatoire respons bewerkstelligen. **In hoofdstuk**

10 werd daarom het ontstekingsremmende effect onderzocht van de proteasoomremmer bortezomib, een boronzuur bevattend dipeptide, dat geregistreerd is voor de behandeling van (therapie-resistente) multipole myeloom patiënten. We konden aantonen dat bortezomib heel effectief is in remming van de $\text{TNF}\alpha$ productie door ex-vivo geactiveerde T-cellen van RA-patiënten, onafhankelijk van hun klinische respons op MTX. Naast remming van $\text{TNF}\alpha$ productie werd ook een opvallende inductie van apoptose gezien in geactiveerd T-cellen, 48 uur na blootstelling aan dit geneesmiddel. Ook vonden we een concentratie-afhankelijke, maar apoptose-onafhankelijke, remming van T-cel activatie door $\alpha\text{CD3/CD28}$. Gezien deze resultaten, het unieke werkingsmechanisme van bortezomib, en het feit dat bortezomib waarschijnlijk ook effectief is tegen DMARD resistente ontstekingscellen, verdient het aanbeveling om dit geneesmiddel en tweede-generatie proteasoomremmers verder te onderzoeken als potentiële anti-reumatica.

De belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift kunnen als volgt worden samengevat:

Belangrijkste bevindingen:

- Chronische blootstelling van ontstekingscellen aan sulfasalazine induceert expressie van het multi-drug resistentie eiwit BCRP op de celmembraan, wat resulteert in sulfasalazine resistentie
- Hoge expressie niveaus van BCRP werden aangetoond op de celmembraan van synoviale macrofagen, wat voor verminderde werkzaamheid van sulfasalazine, methotrexaat en leflunomide (allen BCRP substraten) kan zorgen
- Sulfasalazine is een potente remmer van de opname van methotrexaat via de Reduced Folate Carrier; deze bevinding zou kunnen verklaren waarom er geen synergistisch effect wordt gevonden bij de combinatie van sulfasalazine en methotrexaat in combinatietherapieën
- Nieuwe generatie anti-folaten, ontwikkelt om methotrexaat resistentie bij leukemiepatiënten te omzeilen, blijken zeer effectieve ontstekingsremmers van ex-vivo geactiveerde T-cellen van RA-patiënten. Deze geneesmiddelen zouden kunnen worden gebruikt voor de behandeling van RA-patiënten die falen op behandeling met methotrexaat.
- De folaat receptor- β , die hoog tot expressie komt op synoviale macrofagen, kan worden gebruikt als een selectieve target bij de behandeling van RA-patiënten met nieuwe generatie anti-folaten en voor beeldvorming van (subklinische) ziekte-activiteit
- Het remmen van de cellulaire proteasoomactiviteit met bortezomib veroorzaakt een effectieve remming van de cytokine-productie door geactiveerde T-cellen van RA-patiënten